

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年5月10日 (10.05.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/36631 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/705, C12N 15/12, G01N 33/50, 33/15, A61K 45/00, A61P 7/02

[JP/JP]. 大石崇秀 (OHISHI, Takahide) [JP/JP]. 曾我孝利 (SOGA, Takatoshi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/09534

(22) 国際出願日: 2001年10月31日 (31.10.2001)

(74) 代理人: 森田憲一, 外 (MORITA, Kenichi et al.); 〒173-0004 東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル5階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-334721 2000年11月1日 (01.11.2000) JP
特願2001-003577 2001年1月11日 (11.01.2001) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高崎淳 (TAKASAKI, Jun) [JP/JP]. 松本光之 (MATSUMOTO, Mitsuyuki) [JP/JP]. 蒲原正純 (KAMOHARA, Masazumi) [JP/JP]. 齋藤 哲 (SAITO, Tetsu)

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SCREENING ANTIPLATELET

(54) 発明の名称: 抗血小板剤スクリーニング方法

(57) Abstract: Antiplatelet screening tools selected from among a human ADP receptor P2T_{AC} protein, a functionally equivalent modification thereof or a protein homologous therewith; antiplatelet screening tools selected from among transformed cells having been transformed by expression vectors containing DNAs encoding the respective proteins as described above and expressing the above polypeptides; a method of detecting an ADP receptor P2T_{AC} ligand or an antagonist or an agonist thereof by using the above-described antiplatelet screening tools; and a method of screening an antiplatelet by using this detection method.

(57) 要約:

ヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質、機能的等価改変体、又は相同タンパク質である抗血小板剤スクリーニングツール、及び前記の各種タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である抗血小板剤スクリーニングツールを開示する。また、前記抗血小板剤スクリーニングツールを用いるADP受容体P2T_{AC}リガンド又はアンタゴニスト若しくはアゴニストの検出方法、及び前記検出方法による抗血小板剤のスクリーニング方法を開示する。

WO 02/36631 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

抗血小板剤スクリーニング方法

技術分野

本発明は、抗血小板剤スクリーニング方法に関する。

背景技術

血小板は、ドンネ (Donne) によって1842年に発見 [C. R. Acad. Sci. (Paris), 14, 336-368, 1842] されて以来、長い間、止血に必要な血液中の1成分として扱われてきた。今日では血小板は単に止血機構の主役を演ずるだけでなく、臨床的に注目される動脈硬化の成立、血栓性疾患を含む循環器疾患、癌転移、炎症、移植後の拒絶反応、更には、免疫反応への関与など、多機能性を示すことが明らかにされている。

現在、血栓性疾患及び虚血性疾患に対して、薬剤又は物理的方法によって血行の再開を図る治療が行なわれている。しかしながら、最近、血行再建が行なわれた後に、内皮細胞を含む血管組織の破綻、あるいは、薬剤そのものによる線溶・凝固バランスの崩壊等で、血小板の活性化、粘着、及び／又は凝集が亢進する現象が発見され、臨床的にも問題になっている。例えば、t-PA等を用いた血栓溶解療法により再疎通が得られた後、線溶能及び／又は凝固能が活性化され、全身の凝固・線溶バランスが崩壊することが明らかになってきた。临床上は、再閉塞をもたらし、治療上大きな問題となっている (J. Am. Coll. Cardiol. 12, 616-623, 1988)。

一方、狭心症若しくは心筋梗塞などの冠動脈狭窄、又は大動脈狭窄を基盤とした疾患の治療において、PTCA (Percutaneous transluminal coronary angioplasty) 療法が急速に普及し、一定の成果を挙げている。しかし、この療法は、内皮細胞を含む血管組織を傷害し、急性冠閉塞、更には、3割近くの治療例で発現する再狭窄が大きな問題となっている。

このような血行再建療法後の種々の血栓性弊害（再閉塞等）には、血小板が重要な役割を果たしている。従って、これらの血栓性弊害を予防・治療する薬剤として、抗血小板剤が期待されている。

ところで、血小板の活性化、粘着、及び凝集を惹起又は亢進する重要な因子として、アデノシン二リン酸（Adenosine 5' -diphosphate ; ADP）が知られている。ADPは、コラーゲンやトロンビン等で活性化された血小板から、あるいは、血行再建等により傷ついた血球、血管内皮細胞、又は臓器から放出される。ADPは、血小板膜に存在するGタンパク質共役型のADP受容体P₂Tを介して、血小板を活性化するとされている（Biochem. J., 336, 513-523, 1998）。

血小板ADP受容体としては、Gタンパク質の1種であるG_qに共役してホスホリパーゼC（Phospholipase C ; PLC）を介して細胞内Ca²⁺濃度を上げるタイプの血小板ADP受容体P₂T_{PLC}と、Gタンパク質の1種であるG_iに共役してアデニル酸シクラーゼ（Adenylate cyclase ; AC）の活性を抑制する血小板ADP受容体P₂T_{AC}との存在が示唆されていた。現在、血小板ADP受容体P₂T_{PLC}は、血小板ADP受容体P₂Y₁と呼ばれる受容体であることが同定されているが、血小板ADP受容体P₂T_{AC}は、これまでその実体が同定されていなかった（Kunapuli, S. P. ら, Trends Pharmacol. Sci., 19, 391-394, 1998）。

抗血小板剤として利用されているチクロピジン（Ticlopidine）やクロピドグレル（Clopidogrel）は、体内での代謝物がADP受容体P₂T_{AC}を阻害することで効果をもたらしていると考えられている（Savi, P. J., Pharmacol. Exp. Ther., 269, 772-777, 1994）。また、生体内のADP受容体拮抗物質であるアデノシン三リン酸（ATP）の誘導体として合成されたARL67085は、血小板ADP受容体P₂T_{AC}に対する拮抗作用によりADPによる血小板凝集の抑制作用を有しており、血栓症モデルにおいてその有効性が示されている（Mills, D. C., Thromb. Hemost., 76, 835-856, 1996 ; 及びHum

phries, R. G., Trends Pharmacol. Sci., 16, 179-181, 1995)。更に、Ap4A [P^1, P^4 -di (adenosine-5') tetraphosphate] の誘導体も、血小板ADP受容体P2T_{AC}に対する拮抗作用によりADPによる血小板凝集の抑制作用を有しており、血栓症モデルにおいてその有効性が示されている (Kim, B. K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 2370-2373, 1992)。

以上の知見から、血小板のADP受容体P2T_{AC}に対する拮抗薬は、強力な抗血小板剤となることが期待される。しかし、チクロピジンやクロピドグレルは、抗血栓作用が弱く、しかも、副作用が強い等の問題点を抱えており、また、ATP類縁体であるARL67085若しくはその誘導体、又はAp4Aの誘導体などについても、ADP受容体拮抗薬として研究が進められているが、全てヌクレオチドの誘導体であり、経口活性が充分でなく、しかも、血小板凝集抑制活性が弱いなどの問題を抱えており、強力で経口活性を有するADP受容体拮抗薬が熟望されている (CAPRIE STEERING COMMITTEE, Lancet, 348, 1329-1339, 1996)。

しかしながら、これまで、血小板に存在するADP受容体P2T_{AC}タンパク質は、同定されておらず、簡便な化合物スクリーニング系の構築が困難であったため、ADP受容体P2T_{AC}拮抗薬の開発は進展していなかった。

なお、本発明で用いることのできるヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質と同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA、及び前記DNAがコードする推定アミノ酸配列については、種々の報告 (WO00/22131号、WO00/31258号、WO00/28028号、及びWO98/50549号各パンフレット) があるが、いずれもリガンドが解明されておらず、血小板に存在するADP受容体であるとの記載もない。

発明の開示

従って、本発明の課題は、抗血小板剤として有用なアデノシン二リン酸 (ADP) 受容体P2T_{AC}拮抗薬を得るための簡便なスクリーニング系及び新たな抗血

小板剤を提供することにある。

本発明者は、前記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、 $P2T_{AC}$ 受容体をコードする核酸（具体的にはHORK3遺伝子）を単離することに成功し、塩基配列及び推定アミノ酸配列を決定した。次に、前記受容体をコードする核酸を含むベクター、及び前記ベクターを含む宿主細胞を順次作成し、前記宿主細胞を用いて $P2T_{AC}$ 受容体を発現させることにより、新規な組換え $P2T_{AC}$ 受容体の生産を可能にし、前記受容体がADP受容体 $P2T_{AC}$ 活性を有することから、前記受容体及び前記受容体を発現する細胞が抗血小板剤スクリーニングツールとなることを確認した。また、前記受容体又は前記受容体を発現する細胞を用い、試験化合物がADP受容体 $P2T_{AC}$ リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出する方法、及び前記検出方法を用いた抗血小板剤のスクリーニング方法を確立した。更に、抗血小板作用を示す物質として知られている化合物（具体的には、2MeSAMP又はAR-C69931MX）が、前記検出方法にて前記受容体のアンタゴニスト活性を示すことを確認し、前記受容体のアンタゴニストが確かに抗血小板剤として有用であることを示した。そして、前記検出工程を含む、抗血小板用医薬組成物の製造方法を確立し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、

[1] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド（以下、ヒトADP受容体 $P2T_{AC}$ タンパク質と称することがある）、又は(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、ADPと結合し、Giに共役することにより、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性（以下、ADP受容体 $P2T_{AC}$ 活性と称する）を有するポリペプチド（以下、機能的等価改変体と称する）である、抗血小板剤スクリーニングツール；

[2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、ADPと結合し、Giに共役することにより、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を有するポリペプチド（以下、相同タンパク質と称する）である、抗血小板剤スクリーニングツール（以下、[1]又は

[2] 記載の抗血小板剤スクリーニングツールを、総称して、ポリペプチド型抗

血小板剤スクリーニングツールと称する)；

〔3〕 (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド (すなわち、ヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質)、又は(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、ADPと結合し、G_iに共役することにより、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を有するポリペプチド (すなわち、機能的等価改変体) をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である、抗血小板剤スクリーニングツール；

〔4〕 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、ADPと結合し、G_iに共役することにより、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を有するポリペプチド (すなわち、相同タンパク質) をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である、抗血小板剤スクリーニングツール (以下、〔3〕又は〔4〕記載の抗血小板剤スクリーニングツールを、総称して、形質転換細胞型抗血小板剤スクリーニングツールと称する)；

〔5〕 〔1〕若しくは〔2〕記載のポリペプチド (すなわち、ヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質、機能的等価改変体、又は相同タンパク質)、前記ポリペプチドを含む細胞膜画分、又は〔3〕若しくは〔4〕記載の形質転換細胞と、試験化合物とを、ADP受容体P2T_{AC}標識リガンド存在下で、接触させる工程、及び

前記ポリペプチド、細胞膜画分、又は形質転換細胞への標識リガンドの結合量の変化を分析する工程

を含む、試験化合物がADP受容体P2T_{AC}リガンドであるか否かを検出する方法 (以下、リガンド検出方法と称する)；

〔6〕 C末端のアミノ酸配列が、配列番号11で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性Gタンパク質のホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドとG_iの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるGタンパク質キメラを共発現している〔3〕又は〔4〕記載

の形質転換細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び

前記形質転換細胞内における Ca^{2+} 濃度の変化を分析する工程

を含む、試験化合物がADP受容体 $P2T_{AC}$ アンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する方法（以下、 Ca^{2+} 型検出方法と称する）；

〔7〕〔3〕又は〔4〕記載の形質転換細胞と試験化合物とを、血小板ADP受容体 $P2T_{AC}$ のアゴニストの共存下において、接触させる工程、及び

前記形質転換細胞内におけるcAMP濃度の変化を分析する工程

を含む、試験化合物がADP受容体 $P2T_{AC}$ アンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する方法（以下、cAMP型検出方法と称する）；

〔8〕前記リガンド検出方法、 Ca^{2+} 型検出方法、又はcAMP型検出方法、あるいは、これらを組み合わせることにより、ADP受容体 $P2T_{AC}$ リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出する工程、及び

ADP受容体 $P2T_{AC}$ アンタゴニストを選択する工程

を含む、抗血小板剤をスクリーニングする方法；並びに

〔9〕前記リガンド検出方法、 Ca^{2+} 型検出方法、又はcAMP型検出方法、あるいは、これらを組み合わせることにより、ADP受容体 $P2T_{AC}$ リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出する工程、及び

製剤化工程

を含む、抗血小板用医薬組成物の製造方法

に関する。

前記「Gi」は、受容体と共役して細胞内へのシグナル伝達・増幅因子として機能するGタンパク質のサブファミリーの1つであって、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制するGタンパク質である。アデニル酸シクラーゼの活性が抑制されると、例えば、細胞内cAMP濃度が低下する。

また、前記「ホスホリパーゼC活性促進性Gタンパク質」は、受容体と共役して細胞内へのシグナル伝達・増幅因子として機能するGタンパク質のサブファミリーの1つであって、ホスホリパーゼCの活性を促進するGタンパク質である。ホスホリパーゼCの活性が促進されると、例えば、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。ホスホリパーゼC活性促進性Gタンパク質としては、例えば、Gqを挙げること

ができる。

更に、前記「ADP受容体P2T_{AC}」は、ADP受容体P2T_{AC}を有するポリペプチドを意味する。

図面の簡単な説明

図1は、ヒトクエン酸血由来多血小板血漿（PRP）のADP惹起血小板凝集における2MeSAMPの効果を示すグラフである。

図2は、ヒトクエン酸血由来PRPのADP惹起血小板凝集におけるAR-C69931MXの効果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

（1）抗血小板剤スクリーニングツール

本発明の抗血小板剤スクリーニングツールには、ポリペプチド型抗血小板剤スクリーニングツールと、形質転換細胞型抗血小板剤スクリーニングツールとが含まれる。

1) ポリペプチド型抗血小板剤スクリーニングツール

本発明のポリペプチド型抗血小板剤スクリーニングツールには、

（i）ヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質、すなわち、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである、抗血小板剤スクリーニングツール；

（ii）機能的等価改変体、すなわち、配列番号2で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、ADP受容体P2T_{AC}活性を有するポリペプチドである、抗血小板剤スクリーニングツール；及び

（iii）相同タンパク質、すなわち、配列番号2で表されるアミノ酸配列との相溶性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、ADP受容体P2T_{AC}活性を有するポリペプチドである、抗血小板剤スクリーニングツールが含まれる。

本発明のポリペプチド型抗血小板剤スクリーニングツールとして用いることの

できる、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、342個のアミノ酸残基からなるヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質である。ADP受容体P2T_{AC}タンパク質は、血小板に存在することが示唆されていたものの、本発明者が今回始めてその機能を解明するまで、その実体は同定されていなかった。

そして、本願の優先日後の文献で、初めて、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが血小板ADP受容体であることが公表された[Nature, 409, 11 January 2001, 202-207; J. B. C., 276, (11), March 16, 8608-8615, 2001; WO01/46454号パンフレット]。なお、WO01/46454号パンフレットの優先権の基礎となる特許出願では、ラットのADP受容体遺伝子をクローニングし、配列決定しているものの、ヒトのADP受容体遺伝子については、部分配列を含むクローンを取得し、配列決定しているにすぎない。従って、ヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質及びこれをコードするポリヌクレオチドを取得し、その機能を初めて解明し、これらを用いる抗血小板剤をスクリーニング方法の発明に関する特許出願を行なったのは、本願出願人の方が早い。

本発明のポリペプチド型抗血小板剤スクリーニングツールとして用いることのできる機能的等価改変体は、配列番号2で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所において、それぞれ、1又は複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、ADP受容体P2T_{AC}活性を有するポリペプチドである限り、特に限定されるものではなく、その起源もヒトに限定されない。

例えば、ヒトADP受容体P2T_{AC}のヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来のADP受容体P2T_{AC}又はその変異体が含まれる。更には、それらの天然タンパク質（すなわち、ヒト由来の変異体、又はヒト以外の生物由来のADP受容体P2T_{AC}若しくはその変異体）又はヒトADP受容体P2T_{AC}を元にして遺伝子工学的に人為的に改変したタンパク質などが含まれる。なお、本明細書において「変異体」(variation)とは、同一種内の同一タンパク質にみられる個体差、あるいは、数種間の相同タンパク質にみられる差異を意味する。

ヒトADP受容体P2T_{AC}のヒトにおける変異体、又はヒト以外の生物由来のADP受容体P2T_{AC}若しくはその変異体は、当業者であれば、ヒトADP受容体P2T_{AC}遺伝子の塩基配列（例えば、配列番号1で表される塩基配列）の情報を基にして、取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法（Maniatis, T. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982等）に従って実施することが可能である。

例えば、ヒトADP受容体P2T_{AC}遺伝子の塩基配列の情報を基にして適当なプライマー又はプローブを設計し、前記プライマー又はプローブと、目的とする生物〔例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）〕由来の試料（例えば、総RNA若しくはmRNA画分、cDNAライブラリー、又はファージライブラリー）とを用いてPCR法又はハイブリダイゼーション法を実施することにより、タンパク質の遺伝子を取得し、その遺伝子を適当な発現系を用いて発現させ、発現したタンパク質が、例えば、実施例3又は実施例4に記載の方法により、ADPと結合し、G_iに共役することによってアデニル酸シクラーゼの活性を抑制することを確認することにより、所望のタンパク質を取得することができる。

また、前記の遺伝子工学的に人為的に改変したタンパク質は、常法、例えば、部位特異的突然変異誘発法（site-specific mutagenesis; Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662—5666, 1984）により、タンパク質の遺伝子を取得し、その遺伝子を適当な発現系を用いて発現させ、発現したタンパク質が、例えば、実施例3又は実施例4に記載の方法により、ADPと結合し、G_iに共役することによってアデニル酸シクラーゼの活性を抑制することを確認することにより、所望のタンパク質を取得することができる。

本発明のポリペプチド型抗血小板剤スクリーニングツールとして用いることのできる相同タンパク質は、配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、ADP受容体P2T_{AC}活性を有す

るポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有することができる。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) 検索により得られた値を意味し、アミノ酸配列の相同性は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。具体的には、BLASTパッケージ (sgis32bit版, バージョン2.0.12; NCBIより入手) のblastseqプログラム (Tatiana A. Tatusova及びThomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) を用い、デフォルトパラメーターに従って算出することができる。ペアワイズ・アラインメント・パラメーターとして、プログラム名「blastp」を使用し、Gap挿入Cost値を「0」で、Gap伸長Cost値を「0」で、Query配列のフィルターとして「SEG」を、Matrixとして「BLOSUM62」をそれぞれ使用する。

本発明のポリペプチド型抗血小板剤スクリーニングツールとして用いることのできる各種ポリペプチド (すなわち、ヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質、機能的等価改変体、及び相同タンパク質; 以下、スクリーニングツール用ポリペプチドと称する) は、種々の公知の方法によって得ることができ、例えば、目的タンパク質をコードする遺伝子を用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。より具体的には、後述する形質転換細胞 (すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞) を、スクリーニングツール用ポリペプチドの発現が可能な条件下で培養し、受容体タンパク質の分離及び精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から目的タンパク質を分離及び精製することにより調製することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドを調製する際に、それをコードする遺伝子を取得する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、ヒトADP受容

体P2T_{AC}タンパク質を調製する場合には、それをコードする遺伝子として、例えば、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAを用いることができる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば、利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従って決定することができる (Crantham, R. ら, *Nucleic Acids Res.*, 9, 143-174, 1981)。

配列番号1で表される塩基配列からなるDNAは、例えば、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することにより取得することもできるし、あるいは、ヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質の産生能力を有する細胞又は組織に由来するcDNAライブラリーを鋳型とし、配列番号1で表される塩基配列に基づいて設計した適当なプライマーセットを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法 (Saiki, R. K. ら, *Science*, 239, 487-491, 1988) により、取得することもできる。前記のヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質の産生能力を有する細胞又は組織としては、例えば、ヒト血小板又はヒト脳などを挙げることもできる。また、前記プライマーセットとしては、配列番号3で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号4で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせを挙げることもできる。

スクリーニングツール用ポリペプチドの調製において使用することのできる分離及び精製方法は、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順で実施することができる。例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドを表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁した後、ホモジナイズし、遠心分離することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを含む細胞膜画分を得ることができる。得られた細胞膜画分を可溶化した後、通常のタンパク質沈殿剤による処理、限外濾過、各種液体クロマトグラフィー [例えば、分子ふるいクロマトグラフィー (ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、又は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等]、若しくは透析法、又はこれらの組合せ等により、スクリーニングツール用ポリペプチドを精製することができる。なお、細胞膜画分を可溶化するには、できるだけ緩和な可溶化剤 (例えば、CHAPS、Triton

X-100、又はジキトニン等）を用いることにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドを調製する際には、所望に応じて、スクリーニングツール用ポリペプチドと適当なマーカー配列とをインフレームで融合して発現させることで、前記ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、又は精製等を容易に行なうことができる。前記マーカー配列としては、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサースチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。また、マーカー配列とスクリーニングツール用ポリペプチドとの間に、プロテアーゼ（例えば、エンテロキナーゼ、ファクターXa、又はトロンビンなど）が認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去することが可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体とヘキサースチジン・タグとをトロンビン認識配列で連結した報告がある（Hayashi, M. K. 及びHaga, T., J. Biochem., 120, 1232-1238, 1996）。

2) 形質転換細胞型抗血小板剤スクリーニングツール

本発明の形質転換細胞型抗血小板剤スクリーニングツールには、

(i) ヒトADP受容体P2T_{Ac}タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である、抗血小板剤スクリーニングツール；

(ii) 機能的等価改変体をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である、抗血小板剤スクリーニングツール；及び

(iii) 相同タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である、抗血小板剤スクリーニングツール

が含まれる。

本発明の形質転換細胞型抗血小板剤スクリーニングツールとして用いることのできる各種形質転換細胞（以下、スクリーニングツール用形質転換細胞と称す

る)を作成するために使用することのできる宿主細胞は、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することができる限り、特に限定されるものではなく、例えば、通常使用される公知の微生物、例えば、大腸菌又は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、あるいは、公知の培養細胞、例えば、脊椎動物細胞 (例えば、CHO細胞、HEK293細胞、又はCOS細胞) 又は昆虫細胞 (例えば、Sf9細胞) を挙げることができる。前記脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞 (Gluzman, Y., Cell, 23, 175-182, 1981)、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. 及び Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、あるいは、前記HEK293細胞にエプスタイン・バーウイルスのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社) を挙げるができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞を作成するために使用することのできる発現ベクターは、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することができる限り、特に限定されるものではなく、使用する宿主細胞の種類に応じて、適宜選択することができる。

例えば、脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用することができ、更に必要により、複製起点を有していることができる。前記発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. ら, Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの延長因子プロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又はサイトメガロウイルスプロモーターを有するpCEP4 (Invitrogen社) 等を挙げるができる。

より詳細には、宿主細胞としてCOS細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、更

に、転写プロモーター、転写終結シグナル、及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. 及び Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又は pCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等を挙げることができる。

前記発現ベクターは、例えば、DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. 及び Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. 及び van der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973)、カチオン性リポソーム試薬 (Lipofectamine; Gibco BRL社) を用いた方法、あるいは、電気パルス穿孔法 (Neumann, E. ら, EMBO J., 1, 841-845, 1982) 等により、COS細胞に取り込ませることができる。

また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現することのできるベクター、例えば、pRSVneo (Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 又は pSV2-neo (Southern, P. J. 及び Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

更に、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、エプスタイン・バーウイルスの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4 (Invitrogen社) などを用いることができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞は、常法に従って培養することができ、前記培養により細胞内又は細胞表面にスクリーニングツール用ポリペプチドが生産される。前記培養に用いることのできる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種の培地を適宜選択することができる。例えば、COS細胞の場合には、例えば、RPMI-1640培地又はダルベッコ修正イーグル最小必須培地（DMEM）等の培地に、必要に応じて牛胎仔血清（FBS）等の血清成分を添加した培地を使用することができる。また、293-EBNA細胞の場合には、牛胎仔血清（FBS）等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地（DMEM）等の培地にG418を加えた培地を使用することができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞は、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現している限り、特に限定されるものではない。スクリーニングツール用形質転換細胞は、スクリーニングツール用ポリペプチドに加え、C末端のアミノ酸配列が、配列番号11で表されるアミノ酸配列（Asp-Cys-Gly-Leu-Phe）であるGタンパク質を発現していることが好ましい。配列番号11で表されるアミノ酸配列は、GiのC末端の5アミノ酸残基からなるアミノ酸配列であり、以下、「C末端のアミノ酸配列が配列番号11で表されるアミノ酸配列であるGタンパク質」を「C末端Gi型Gタンパク質」と称する。

前記C末端Gi型Gタンパク質としては、例えば、（1）Gi、又は（2）C末端のアミノ酸配列が、配列番号11で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性Gタンパク質（例えば、Gq）のホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドとGiの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるGタンパク質キメラを挙げることができる。以下、GqのホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドとGiの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるGタンパク質キメラを、Gqiと称する。

スクリーニングツール用ポリペプチドは、GiのC末端の5アミノ酸残基からなるアミノ酸配列（すなわち、配列番号11で表されるアミノ酸配列）を認識して、Giと結合する。従って、スクリーニングツール用ポリペプチドは、Giの

みならず、G_qiとも結合することができる。スクリーニングツール用形質転換細胞において、スクリーニングツール用ポリペプチドとC末端G_i型Gタンパク質とが発現されると、これらのポリペプチドは細胞内で結合することができる。

前記G_qiにおける「G_qのホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチド」は、G_qと共役する血小板ADP受容体P₂T_{PLC}との結合に必要なC末端アミノ酸配列を含まず、しかも、ホスホリパーゼCの活性を促進する活性を有する限り、特に限定されるものではないが、例えば、C末端の5アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を欠失したG_qのN末端側部分ポリペプチドを挙げることができる。

前記G_qiにおける「G_iの受容体共役活性を有する部分ポリペプチド」は、G_iのC末端の5アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、しかも、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を有しない限り、特に限定されるものではないが、例えば、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるG_iのC末端側部分ポリペプチドを挙げることができる。

(2) ADP受容体P₂T_{AC}リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニスト検出方法

前記スクリーニングツール用ポリペプチド、又はスクリーニングツール用形質転換細胞を検出ツールに用いて、試験化合物がADP受容体P₂T_{AC}リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出することができる。

本発明による、試験化合物がADP受容体P₂T_{AC}リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出する方法には、

- 1) 血小板のADP受容体P₂T_{AC}に対するリガンドであるか否かを検出する方法（すなわち、リガンド検出方法）；
- 2) 形質転換細胞内におけるCa²⁺濃度の変動を指標として、血小板のADP受容体P₂T_{AC}に対するアンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する方法（すなわち、Ca²⁺型検出方法）；
- 3) 形質転換細胞内におけるcAMP量の変動を指標として、血小板のADP受容体P₂T_{AC}に対するアンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する方法（すなわち、cAMP型検出方法）；及び

4) GTP γ S結合法を利用する血小板のADP受容体P2T_{AC}に対するアンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する方法（以下、GTP γ S結合型検出方法と称する）

が含まれる。これらの検出方法について、順次説明する。

1) リガンド検出方法

本発明のリガンド検出方法は、(i) ヒトADP受容体P2T_{AC}タンパク質、機能的等価改変体、又は相同タンパク質（以下、検出ツール用ポリペプチドと称する）、検出ツール用ポリペプチドを含む細胞膜画分、あるいは、検出ツール用ポリペプチドを発現させた形質転換細胞（以下、検出ツール用ポリペプチド、前記細胞膜画分、及び前記形質転換細胞を総称して、リガンド検出ツールと称する）と、(ii) 標識リガンドとを用いる限り、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により実施することができる。

まず、リガンド検出ツールを調製する。アッセイ条件（例えば、使用する緩衝液の種類及び濃度、緩衝液に添加するイオンの種類及び濃度、並びにアッセイ系のpH）を最適化し、最適化したバッファー中で、リガンド検出ツールと、標識リガンドとを、試験化合物と共に一定時間インキュベーションする。前記標識リガンドとしては、例えば、[³H] 2-メチルチオールADP (2MeSADP) を用いることができる。反応後、反応液をガラスフィルター等で濾過し、適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。得られた放射活性リガンドの結合阻害を指標として、ADP受容体P2T_{AC}に対するリガンドであるか否かを検出することができる。すなわち、試験化合物不在下の場合のフィルター残存放射活性よりも、試験化合物存在下の場合のフィルター残存放射活性が低下した場合には、前記試験化合物は、ADP受容体P2T_{AC}に対するリガンドであると判定することができる。例えば、実施例6に記載の条件で行なうことができる。

2) Ca²⁺型検出方法

本発明のCa²⁺型検出方法は、形質転換細胞として、(i) 検出ツール用ポリペプチドと、(ii) C末端のアミノ酸配列が、配列番号11で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性Gタンパク質のホスホリパー

ぜC活性促進活性を有する部分ポリペプチドとGiの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるGタンパク質キメラ（例えば、Gqi）とを共発現している形質転換細胞（以下、Ca²⁺型検出用形質転換細胞と称する）を使用する。なお、前記形質転換細胞は、形質転換する前の宿主細胞が、ADPを作用させても細胞内Ca²⁺濃度が上昇しない細胞であることが好ましい。このような細胞としては、例えば、ラットグリオーマ細胞株の一種であるC6-15（Change, K. ら, J. Biol. Chem., 270, 26152-26158, 1995）を挙げることができる。

本発明のCa²⁺型検出方法においてアゴニストであるか否かを検出する場合には、Ca²⁺型検出用形質転換細胞と試験化合物とを接触させ、前記Ca²⁺型検出用形質転換細胞内のCa²⁺濃度の変化を、直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）する。Ca²⁺濃度の変化は、例えば、カルシウム結合性蛍光試薬（例えば、fura2又はfluo3等）を用いて、直接的にCa²⁺濃度の変化を分析することもできるし、あるいは、Ca²⁺濃度に依存して転写量が調節される遺伝子〔例えば、ルシフェラーゼの遺伝子の上流にアクチベータープロテイン1（AP1）応答配列を挿入した遺伝子〕の転写活性を分析することにより、間接的にCa²⁺濃度の変化を分析することもできる。

Ca²⁺型検出用形質転換細胞と試験化合物とを接触させた場合に、Ca²⁺型検出用形質転換細胞内のCa²⁺濃度が上昇すれば、前記試験化合物は、ADP受容体P2T_{Ac}に対するアゴニストであると判定することができる。なお、コントロールとして、検出ツール用ポリペプチドとGqiとを共発現しているCa²⁺型検出用形質転換細胞の代わりに、検出ツール用ポリペプチドが発現されておらず、しかも、Gqiが発現しているコントロール用形質転換細胞、あるいは、形質転換前の宿主細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物により前記コントロール用形質転換細胞又は前記宿主細胞内のCa²⁺濃度が上昇しないことを確認することが好ましい。

本発明のCa²⁺型検出方法においてアンタゴニストであるか否かを検出する場合には、Ca²⁺型検出用形質転換細胞と試験化合物とを、血小板ADP受容体P2T_{Ac}のアゴニスト（例えば、2MeSADP又はADP）の共存下において接

触させ、 Ca^{2+} 型検出用形質転換細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化を、直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）する。 Ca^{2+} 型検出用形質転換細胞と試験化合物とを、血小板ADP受容体 $\text{P}2\text{T}_{\text{Ac}}$ のアゴニストの共存下において接触させた場合に、前記アゴニストによる Ca^{2+} 型検出用形質転換細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇が、前記試験化合物により阻害又は抑制されれば、前記試験化合物は、ADP受容体 $\text{P}2\text{T}_{\text{Ac}}$ に対するアンタゴニストであると判定することができる。例えば、実施例3に記載の条件で行なうことができる。

なお、コントロールとして、 Ca^{2+} 型検出用形質転換細胞と血小板ADP受容体 $\text{P}2\text{T}_{\text{Ac}}$ のアゴニストとを、試験化合物の不在下において接触させ、前記アゴニストによる Ca^{2+} 型検出用形質転換細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇の程度を確認しておくことが必要である。

これまで説明したように、本発明の Ca^{2+} 型検出方法においては、共役タンパク質としてGiをそのまま使用するのではなく、Gqiを使用するので、cAMP濃度ではなく、 Ca^{2+} 濃度を分析することによりアンタゴニスト又はアゴニストであるか否かの検出を実施することができる。通常、cAMP濃度に比べ、 Ca^{2+} 濃度の方が、より簡易且つ迅速に測定することができる。

3) cAMP型検出方法

本発明のcAMP型検出方法は、形質転換細胞として、検出ツール用ポリペプチドを発現している形質転換細胞（以下、cAMP型検出用形質転換細胞と称する）を使用する。通常の宿主細胞ではGiが構成的に発現しているので、検出ツール用ポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより、cAMP型検出用形質転換細胞を得ることができる。なお、前記形質転換細胞は、形質転換する前の宿主細胞が、ADPを作用させても細胞内cAMP濃度が低下しない細胞であることが好ましい。このような細胞としては、例えば、CHO細胞を挙げることができる。

本発明のcAMP型検出方法においてアゴニストであるか否かを検出する場合には、cAMP型検出用形質転換細胞と試験化合物とを接触させ、前記cAMP型検出用形質転換細胞内のcAMP濃度の変化を、直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）する。cAMP型検出用形質転換細胞と試験化合物とを

接触させる際には、cAMP濃度を上昇させることのできる化合物（例えば、フォルスコリン）を共存させることが好ましい。

cAMP濃度の変化は、例えば、市販のcAMP測定キット（Amersham社等）を用いて、直接的にcAMP濃度の変化を分析することもできるし、あるいは、cAMP濃度に依存して転写量が調節される遺伝子〔例えば、ルシフェラーゼの遺伝子上流にcAMP応答配列（CRE）を挿入した遺伝子〕の転写活性を分析することにより、間接的にcAMP濃度の変化を分析することもできる。

cAMP型検出用形質転換細胞と試験化合物とを接触させた場合に、cAMP型検出用形質転換細胞内のcAMP濃度が低下すれば、前記試験化合物は、ADP受容体P2T_{AC}に対するアゴニストであると判定することができる。この場合、cAMP濃度を上昇させることのできる化合物（例えば、フォルスコリン）を共存させておくと、試験化合物によるcAMP濃度の低下を、より容易に判定することができる。また、コントロールとして、検出ツール用ポリペプチドとGiとを発現しているcAMP型検出用形質転換細胞の代わりに、検出ツール用ポリペプチドが発現されていない宿主細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物により前記宿主細胞内のcAMP濃度が低下しないことを確認することが好ましい。

本発明のcAMP型検出方法においてアンタゴニストであるか否かを検出する場合には、cAMP型検出用形質転換細胞と試験化合物とを、血小板ADP受容体P2T_{AC}のアゴニスト（例えば、2MeSADP又はADP）の共存下において接触させ、前記cAMP型検出用形質転換細胞内のcAMP濃度の変化を、直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）する。cAMP型検出用形質転換細胞と試験化合物とを、血小板ADP受容体P2T_{AC}のアゴニスト（例えば、2MeSADP又はADP）の共存下において接触させた場合に、前記アゴニストによるcAMP型検出用形質転換細胞内のcAMP濃度の低下が、前記試験化合物により阻害又は抑制されれば、前記試験化合物は、ADP受容体P2T_{AC}に対するアンタゴニストであると判定することができる。この場合、cAMP濃度を上昇させることのできる化合物（例えば、フォルスコリン）を共存させておく

と、試験化合物によるcAMP濃度の変動を、より容易に判定することができる。
例えば、実施例4又は実施例5に記載の条件で、行うことができる。

また、コントロールとして、cAMP型検出用形質転換細胞と血小板ADP受容体P2T_{AC}のアゴニストとを、試験化合物の不在下において接触させ、前記アゴニストによるcAMP型検出用形質転換細胞内のcAMP濃度の低下の程度を確認しておくことが必要である。

4) GTP γ S結合型検出方法

本発明のGTP γ S結合型検出方法は、検出ツール用ポリペプチド、前記ポリペプチドを含む細胞膜画分、あるいは、前記ポリペプチドを発現させた形質転換細胞を用いて、GTP γ S結合法(Lazarenco, S. 及びBirdsall, N. J. M., Br. J. Pharmacol., 109, 1120-1127, 1993)を利用して、血小板のADP受容体P2T_{AC}に対するアンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出することができる。

例えば、以下の手順により実施することができる。

すなわち、検出ツール用ポリペプチドを発現させた細胞膜を、20mmol/L-HEPES (pH 7.4)、100mmol/L-NaCl、10mmol/L-MgCl₂、及び50mmol/L-GDP混合溶液中で、³⁵Sで標識されたGTP γ S (400pmol/L)と混合する。試験化合物存在下と試験化合物不在下とでインキュベートした後、反応液をガラスフィルター等で濾過し、フィルターに残存するGTP γ Sの放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。試験化合物存在下における特異的なGTP γ S結合の上昇を指標に、ADP受容体P2T_{AC}に対するアゴニストであるか否かを検出することができる。また、試験化合物存在下における、血小板ADP受容体P2T_{AC}のリガンド(例えば、2MeSADP又はADP)によるGTP γ S結合上昇の抑制を指標に、ADP受容体P2T_{AC}に対するアンタゴニストであるか否かを検出することができる。

(3) 抗血小板剤スクリーニング方法

本発明の抗血小板剤スクリーニングツール(ポリペプチド型抗血小板剤スクリーニングツール及び形質転換細胞型抗血小板剤スクリーニングツールの両方を含

む)を用いると、血小板のADP受容体P₂T_{AC}に対するリガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストをスクリーニングすることができる。

既に説明したように、ADPは、血小板の活性化、粘着、及び凝集を惹起又は亢進する重要な因子として知られている。また、ADPは、血小板膜に存在するGタンパク質共役型のADP受容体P₂Tを介して、血小板を活性化されると言われている(Biochem. J., 336, 513-523, 1998)。更に、公知の抗血小板剤であるチクロピジンやクロピドグレルは、体内での代謝物がADP受容体P₂T_{AC}を阻害することで効果をもたらしていると考えられている(Savi, P. J., Pharmacol. Exp. Ther., 269, 772-777, 1994)し、ATP類縁体であるARL67085若しくはその誘導体、又はAp₄A[P¹, P⁴-di(adenosine-5') tetraphosphate]の誘導体などは、P₂T_{AC}拮抗作用によりADPによる血小板凝集の抑制作用を有していることが示されている(Mills, D. C., Thromb. Hemost., 76, 835-856, 1996; Humphries, R. G., Trends Pharmacol. Sci., 16, 179-181, 1995; 及びKim, B. K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 2370-2373, 1992)。そして、実施例7で示したとおり、ADP受容体P₂T_{AC}アンタゴニスト(例えば、2MeSAMP又はAR-C69931MX)は、抗血小板作用を有する。

これらの知見によれば、血小板のADP受容体P₂T_{AC}に対するリガンド又はアンタゴニストは、血小板の活性化、粘着、及び凝集を制御することのできる物質として有用である。従って、これまで説明したスクリーニングツール用ポリペプチドそれ自体、あるいは、スクリーニングツール用形質転換細胞それ自体を、抗血小板剤のスクリーニングに用いることができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドそれ自体、あるいは、スクリーニングツール用形質転換細胞それ自体を、スクリーニングツールとして使用することができる。

本発明の抗血小板剤スクリーニングツールを用いてスクリーニングにかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物(ペプチドを含む)、コンビナ

トリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明の抗血小板剤スクリーニングツールにより選択された化合物 (ペプチドを含む) を、化学的又は生物学的に修飾した化合物 (ペプチドを含む) を用いることができる。

本発明のスクリーニング方法は、検出方法により、以下の4つに大別されるが、いずれかの方法を用いて、あるいは、これらを組み合わせて、ADP受容体P2T_{AC}に対するリガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出し、試験化合物の中からアンタゴニストを選択することによって、抗血小板剤として有用な物質をスクリーニングすることができる。以下、本発明のスクリーニング方法、

- 1) 血小板のADP受容体P2T_{AC}に対するリガンドをスクリーニングする方法 (以下、リガンドスクリーニング方法と称する) ;
- 2) 形質転換細胞内におけるCa²⁺濃度の変動を指標として、血小板のADP受容体P2T_{AC}に対するアンタゴニスト又はアゴニストをスクリーニングする方法 (以下、Ca²⁺型スクリーニング方法と称する) ;
- 3) 形質転換細胞内におけるcAMP量の変動を指標として、血小板のADP受容体P2T_{AC}に対するアンタゴニスト又はアゴニストをスクリーニングする方法 (以下、cAMP型スクリーニング方法と称する) ; 及び
- 4) GTPγS結合法を利用する血小板のADP受容体P2T_{AC}に対するアンタゴニスト又はアゴニストをスクリーニングする方法 (以下、GTPγS結合型スクリーニング方法と称する)

について、順次説明する。

1) リガンドスクリーニング方法

本発明のリガンドスクリーニング方法は、本発明のリガンド検出方法により、

ADP受容体P2T_{AC}リガンドであるか否かを検出する工程、及びADP受容体P2T_{AC}リガンドを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

前記リガンド検出方法により得られた放射活性リガンドの結合阻害を指標として、ADP受容体P2T_{AC}に対するリガンドをスクリーニングすることができる。例えば、実施例6に記載の条件で、試験化合物を一定時間作用させ、^[3H]-2MeSADPの結合阻害を指標に、そのIC₅₀が10μM以下（更に好ましくは1μM以下）の試験化合物を、リガンドとして選択することができる。

本発明のリガンドスクリーニング方法でスクリーニングしたリガンドを、更に、以下に説明するCa²⁺型スクリーニング方法、cAMP型スクリーニング方法、及び／又はGTPγS結合型スクリーニング方法にかけ、アンタゴニストをスクリーニングすることにより、抗血小板剤として有用な物質をスクリーニングすることができる。

2) Ca²⁺型スクリーニング方法

本発明のCa²⁺型スクリーニング方法は、本発明のCa²⁺型検出方法により、ADP受容体P2T_{AC}アンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する工程、及びADP受容体P2T_{AC}アンタゴニスト又はアゴニストを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

アゴニストは、前記Ca²⁺型検出方法において、試験化合物によるCa²⁺型検出用形質転換細胞内のCa²⁺濃度の上昇を指標に、スクリーニングすることができる。

アンタゴニストは、前記Ca²⁺型検出方法において、血小板ADP受容体P2T_{AC}のアゴニスト（例えば、2MeSADP又はADP）によるCa²⁺型検出用形質転換細胞内のCa²⁺濃度の上昇が、試験化合物により阻害又は抑制されることを指標に、スクリーニングすることができる。

例えば、実施例3に記載の条件で、試験化合物を一定時間作用させ、2MeSADP又はADPによる細胞内Ca²⁺濃度の上昇の阻害を指標に、そのIC₅₀が10μM以下（更に好ましくは1μM以下）の試験化合物を、アンタゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

本発明のCa²⁺型スクリーニング方法でアンタゴニストをスクリーニングする

ことにより、抗血小板剤として有用な物質をスクリーニングすることができる。

3) cAMP型スクリーニング方法

本発明のcAMP型スクリーニング方法は、本発明のcAMP型検出方法により、ADP受容体P2T_{AC}アンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する工程、及びADP受容体P2T_{AC}アンタゴニスト又はアゴニストを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

アゴニストは、前記cAMP型検出方法において、試験化合物によるcAMP型検出用形質転換細胞内のcAMP濃度低下を指標に、スクリーニングすることができる。

アンタゴニストは、前記cAMP型検出方法において、血小板ADP受容体P2T_{AC}のアゴニスト（例えば、2MeSADP又はADP）によるcAMP型検出用形質転換細胞内のcAMP濃度の低下が、試験化合物により阻害又は抑制されることを指標にスクリーニングすることができる。

例えば、実施例4又は実施例5に記載の条件で、試験化合物を一定時間作用させ、2MeSADP又はADPによる細胞内cAMP濃度の低下の阻害を指標に、そのIC₅₀が10μM以下（更に好ましくは1μM以下）の試験化合物を、アンタゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

本発明のcAMP型スクリーニング方法でアンタゴニストをスクリーニングすることにより、抗血小板剤として有用な物質をスクリーニングすることができる。

4) GTPγS結合型スクリーニング方法

本発明のGTPγS結合型スクリーニング方法は、本発明のGTPγS結合型検出方法により、ADP受容体P2T_{AC}アンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する工程、及びADP受容体P2T_{AC}アンタゴニスト又はアゴニストを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

アゴニストは、前記GTPγS結合型検出方法における、試験化合物による特異的なGTPγS結合の上昇を指標にスクリーニングすることができる。

また、アンタゴニストは、血小板ADP受容体P2T_{AC}のアゴニスト（例えば、2MeSADPやADP）によるGTPγS結合上昇が、試験化合物により抑制されることを指標に、スクリーニングすることができる。

本発明のGTP γ S結合型スクリーニング方法でアンタゴニストをスクリーニングすることにより、抗血小板剤として有用な物質をスクリーニングすることができる。

(4) 抗血小板用医薬組成物の製造

本発明には、前記2)～4)記載のスクリーニング方法により、あるいは、

1)～4)記載のスクリーニング方法を組み合わせることにより選択されるADP受容体P2T_{AC}アンタゴニストである物質（例えば、化合物、ペプチド、抗体、又は抗体断片）を有効成分とする抗血小板剤が包含される。

選択されたADP受容体P2T_{AC}アンタゴニストが抗血小板作用を有することは、例えば、実施例7記載の方法で、ヒト血小板凝集阻害活性を検出することにより、確認することができる。

また、抗血小板用医薬組成物の品質規格の確認試験において、本発明のリガンド検出方法、Ca²⁺型検出方法、cAMP型検出方法、及び／又はGTP γ S結合型検出方法によるADP受容体P2T_{AC}リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出する工程、及び製剤化工程を含む、抗血小板用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

本発明のADP受容体P2T_{AC}アンタゴニスト（例えば、化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注若しくは筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあっては、静注等の非経口投与又は消化を受けない製剤化手段、例えば、WO95/28963号パンフレットに記載の製剤化手段が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、

又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水溶性若しくは非水溶性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1～100mg、好ましくは0.1～50mgである。また、非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01～50mg、好ましくは0.01～10mgである。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982等) に従って実施することが可能である。

実施例1: ADP受容体P2T_{Ac}遺伝子HORK3の単離

本実施例では、以下に示す手順に従って、ヒト脳cDNA (Clontech社製) をテンプレートとして、PCR法により、ADP受容体P2T_{Ac}遺伝子HORK3 (以下、単に、HORK3遺伝子と称する) の全長cDNAを取得した。

すなわち、配列番号3で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、配列番号4で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いた。なお、前記フォワードプライマー及びリバースプライマーの各々の5'末端には、XbaI認識部位を含む塩基配列が付加されている。PCRは、Taq DNAポリメラーゼ (Ex Taq DNA polymerase; 宝酒造社製) を用いて、5%ジメチルスルホキシド (DMSO) 存在下で、94℃ (20秒間) / 58℃ (20秒間) / 74℃ (1.5分間) からなるサイクルを5回、94℃ (20秒間) / 55℃ (20秒間) / 74℃ (1.5分間) からなるサイクルを5回、そして、94℃ (20秒間) / 50℃ (20秒間) / 74℃ (1.5分間) からなるサイクルを25回、順次繰り返した。その結果、約1.0kbpのDNA断片が増幅された。このDNA断片をXbaIで消化した後、プラスミドpEF-BOS-dhfr (Mizushima, S. 及びNagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990) のXbaI部位に挿入することにより、プラスミドpEF-BOS-dhfr-HORK3を得た。

プラスミドpEF-BOS-dhfr-HORK3におけるHORK3遺伝子の塩基配列は、DNAシーケンサー (ABI377 DNA Sequencer; Applied Biosystems社製) を用いてジデオキシターミネーター法により決定した。HORK3遺伝子の塩基配列は、配列番号1で表される塩基配列のとおりであった。

配列番号1で表される塩基配列は、1029塩基のオープンリーディングフレーム(ORF)を有しており、このORFから予測されるアミノ酸配列(342アミノ酸)は、配列番号2で表されるアミノ酸配列のとおりであった。

実施例2：血球細胞におけるHORK3遺伝子の発現分布の確認

健康人ボランティアよりヘパリン採血し、 $400 \times g$ で10分間遠心処理を行った。得られた上層を多血小板血漿として分取した。

また、下層には6%デキストラン/生理食塩水を1/3量加えて室温にて1時間放置した。その上清を取り、 $150 \times g$ で5分間遠心処理した後、沈渣をHBSS(Hanks' Balanced Salt Solution)に懸濁した。これを等量のフィコール(Ficoll Paque; Pharmacia社)に重層し、 $400 \times g$ で30分間遠心処理を行った。こうして得られた中間層を「単核球画分」として、沈渣を多形核白血球として分取した。

前記多形核白血球にCD16マイクロビーズ(第一化学薬品社製)を加え、磁器スタンドにて「好中球画分」と「好酸球画分」とに分離した。

また、先に得られた前記多血小板血漿に最終濃度 2 mmol/L になるようにEDTAを加え、 $2500 \times g$ で15分間遠心し、得られた沈殿を $120 \text{ mmol/L-NaCl/2 mmol/L-EDTA/30 mmol/L-Tris-HCl (pH 7.4)}$ に再懸濁した後、再び $2500 \times g$ で15分間遠心して得られた沈殿を「血小板画分」とした。単核球画分、好中球画分、及び好酸球画分は、それぞれ生理食塩水にて洗浄した。

単核球画分、好中球画分、好酸球画分、及び血小板画分から、市販の総RNA精製試薬(isogen; 日本ジーン社製)を用いて総RNAをそれぞれ精製した。各分画由来の総RNA $5 \mu\text{g}$ をDNアーゼ(DNase; Nippon Gene社製)を用いて 37°C で15分間反応させた。DNアーゼ処理した総RNAをスーパースクリプトファーストストランドシステム(RT-PCR用)(GIBCO社製)を用いてcDNAに変換した。

血球細胞でのHORK3 mRNA発現量の検討は、前記の各cDNAを鋳型として、シーケンスディテクター(Prism7700 Sequence Detector; Applied Biosystems社製)を用いて行なっ

た。配列番号5で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号6で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを、プライマーセットとして用いた。また、5'側を蛍光指示薬FAM (6-carboxy-fluorescein) で標識し、3'側を蛍光指示薬TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) で標識した配列番号7で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、HORK3 cDNAを特異的に認識するプローブとして用いた。

PCRは、市販のPCR試薬 (TaqMan PCR core reagent; Applied Biosystems社製) を用い、5%DMSO存在下で、95℃ (15秒間) / 60℃ (60秒間) からなるサイクルを50回繰り返した。また、mRNA発現量算出の標準曲線を得るために、ヒトゲノムDNAを鋳型として、前記プライマーセット及びプローブを用いて同条件のPCRを行なった [J. Neurosci. Methods. 98, 9-20 (2000)]。

更に、内部標準として、ヒトβ-アクチンの発現量を算出するために、前記の各cDNA及びヒトゲノムDNAをそれぞれ鋳型として、配列番号8で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号9で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーセットとし、5'側を蛍光指示薬FAMで標識し、3'側を蛍光指示薬TAMRAで標識した配列番号10で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをβ-アクチンを特異的に認識するプローブとして用い、同条件のPCRを行なった。

単核球画分、好中球画分、好酸球画分、及び血小板画分の各画分におけるβ-アクチンmRNAの発現量は、それぞれ、総RNA 1 ng当たり、15000コピー、19000コピー、25000コピー、及び33000コピーであった。それに対して、HORK3 mRNAは、血小板特異的に発現しており (コピー数=805)、単核球、好中球、及び好酸球ではほとんど発現していないことがわかった。

実施例3: HORK3タンパク質及びGαiを共発現させたC6-15細胞における2MeSADP又はADPによる細胞内Ca²⁺濃度の上昇の確認

ADP又は2MeSADP(2-メチルチオーADP)等のプリン類の多くは、細胞に作用させると、内在性の細胞膜受容体を介して細胞内 Ca^{2+} の上昇を認める。そのため、外来性に導入した遺伝子由来のタンパク質が、ADP又は2MeSADPに反応するか否かを検定するためには、これらの物質に反応しない細胞を用いてタンパク質を発現させることが好ましい。ラットグリオーマ細胞株の一種であるC6-15は、ADP等に反応しないことが知られている(Change, K. ら, J. Biol. Chem., 270, 26152-26158, 1995)。本実施例では、HORK3タンパク質を発現させる細胞としてC6-15を使用した。

また、HORK3タンパク質を発現させるための発現プラスミドとして、前記実施例1で得られたプラスミドpEF-BOS-dhfr-HORK3を用いた。

本実施例で使用したGqとGiとのキメラタンパク質を発現するための発現プラスミドは、Conklin, B. R. らの方法(Nature, 363, 274-276, 1993)に従い、GqのC末端側の5アミノ酸(Glu-Tyr-Asn-Leu-Val; 配列番号12で表されるアミノ酸配列)を、GiのC末端側の5アミノ酸(Asp-Cys-Gly-Leu-Phe; 配列番号11で表されるアミノ酸配列)と置換して構築した遺伝子(以下、Gqi遺伝子と称する)を、プラスミドpEF-BOSにクローニングして作製した。構築したプラスミドは、プラスミドpEF-BOS-Gqiと命名した。

96ウェルプレート(96well Black/clear bottom plat, collagen I coated; BECTON DICKINSON社製)に、C6-15細胞を、1ウェル当たり 2×10^4 細胞となるように播種して48時間培養した後、プラスミドpEF-BOS-dhfr-HORK3(1ウェル当たり50ng)とプラスミドpEF-BOS-Gqi(1ウェル当たり50ng)との組み合わせを、トランスフェクション試薬(LipofectAMINE 2000; GIBCO BRL社製)を用いて遺伝子導入した。なお、コントロールとして、プラスミドpEF-BOS-dhfr-HORK3とプラスミドpEF-BOS-Gqiとの組み合わせに代えて、プラスミドpEF-BOS-dhfr(すなわち、HORK3遺伝子を含まない空ベクタ

一) とプラスミド pEF-BOS-Gqi との組み合わせを用いて遺伝子導入した。

前記の遺伝子導入操作から24時間経過した後、培地を廃棄し、 $4\mu\text{mol/L}$ Fluor-3, AM (Molecular Probe社製)、0.004% プルロニックアシッド (商標=Pluronic F127, Molecular Probe社製)、1% ウシ胎仔血清 (FBS)、 20mmol/L HEPES、及び 2.5mmol/L プロベネシドを含むHBBS (Hanks' Balanced Salt Solution) (1ウェル当たり $100\mu\text{L}$) を添加し、 37°C で1時間インキュベーションした。細胞を 20mmol/L HEPES及び 2.5mmol/L プロベネシド含有HBBS (GIBCO社製) で4回洗浄した後、 20mmol/L HEPES及び 2.5mmol/L プロベネシド含有HBBS (1ウェル当たり $100\mu\text{L}$) を添加した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は、FLIPR (Molecular Device社製) を用いて経時的に測定した。すなわち、測定開始から10秒経過後に、 2MeSADP 又は ADP を、最終濃度 $3 \times 10^{-5}\text{mol/L} \sim 1 \times 10^{-12}\text{mol/L}$ になるように、ウェルに添加し、添加後、50秒間は1秒ごとに、更に4分間は6秒ごとに蛍光強度を測定した。

プラスミド pEF-BOS-dhfr-HORK3 とプラスミド pEF-BOS-Gqi との組み合わせを遺伝子導入した細胞では、 2MeSADP 又は ADP の濃度依存的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された。一方、プラスミド pEF-BOS-dhfr (空ベクター) とプラスミド pEF-BOS-Gqi との組み合わせを遺伝子導入した細胞では、 2MeSADP 又は ADP による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は観察されなかった。

プラスミド pEF-BOS-dhfr-HORK3 とプラスミド pEF-BOS-Gqi とを遺伝子導入した細胞における 2MeSADP 又は ADP による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定し、 2MeSADP 又は ADP の各濃度におけるピーク値をプロットして、ロジスティック (Logistic) 回帰法により濃度依存性を解析した。その結果、 2MeSADP の EC_{50} は、 5.4nmol/L であり、 ADP の EC_{50} は、 220nmol/L であることがわかった。以上の

ように、検出ツール用ポリペプチドとGq α とを共発現させたCa²⁺型検出用形質転換細胞では、2MeSADP又はADPに反応して容量依存的に細胞内Ca²⁺濃度の変化を誘導することが確認された。

以上のことから、検出用ポリペプチドの1つであるHORK3タンパク質は、ADPに反応する受容体であり、Giに共役していることが判明した。また、本実施例の結果から明らかなように、検出ツール用ポリペプチドの1つであるHORK3タンパク質及びGq α を共発現するC6-15細胞の細胞内Ca²⁺濃度の変化を測定することで、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニングが可能となった。

実施例4：HORK3タンパク質を発現するCHO細胞における2MeSADP又はADPによるcAMP産生阻害の確認

前記実施例3により、前記ADP受容体がGi共役型受容体であることが判明したことから、前記ADP受容体はアデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を持っていることが予測される。そこで、本発明のcAMP型スクリーニング方法を実施するには、前記ADP受容体タンパク質を発現させるための宿主細胞として、ADPや2MeSADPによってアデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を持っていない細胞株を選択することが好ましい。以下の方法に従い、ADPや2MeSADPによってフォスコリン刺激によるcAMPの産生量を下げない細胞を検索した結果、CHO細胞が最適であることが判明したので、前記ADP受容体タンパク質を発現させるための細胞としてCHO細胞を用いた。なお、本実施例では、核酸の新生合成に必須の酵素であるジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)を欠失した細胞株[CHO-dhfr(-)株]を特に使用した。HORK3タンパク質を発現させるための発現プラスミドとしてpEF-BOS-dhfr-HORK3を使用した。

10cmシャーレに、CHO-dhfr(-)株を、 1×10^6 細胞となるように、 α MEM(核酸存在)培地を用いて播種し、1日培養した後、プラスミドpEF-BOS-dhfr-HORK3(8 μ g)をトランスフェクション試薬(LipofectAMINE 2000; GIBCO BRL社製)を用いて遺伝子導入した。なお、コントロールとして、プラスミドpEF-BOS-dh

fr-HORK3に代えて、プラスミドpEF-BOS-dhfr（すなわち、HORK3遺伝子を含まない空ベクター）を用いて遺伝子導入した。

前記の遺伝子導入操作から24時間経過した後、遺伝子導入した細胞を回収し、DHFRの競合的阻害剤である100nmol/Lメトトレキサート（和光純薬社製）を含有する α MEM（核酸非存在）培地に懸濁した後、段階希釈して10cmシャーレに播き直した。2週間後に出現したコロニーを個別に取得し、HORK3タンパク質発現CHO細胞、あるいは、コントロール用の空ベクター導入CHO細胞として、以下の実験に使用した。

HORK3タンパク質発現CHO細胞又は空ベクター導入CHO細胞を、24ウェルプレートに、1ウェル当たり 1×10^5 細胞となるように播種した。1日培養した後、1mmol/L-3-イソブチルー1-メチルキサンチン（Sigma社製）及び0.1%BSA含有 α MEM（核酸非存在）培地で10分間処理した後、3 μ mol/Lフォルスコリン（和光純薬社製）と2MeSADP（最終濃度= $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/L）との組み合わせ、あるいは、3 μ mol/LフォルスコリンとADP（最終濃度= $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L）との組み合わせを滴下した。37℃で30分間インキュベートした後、培養上清を除去し、cAMP-EIAシステム（BIOTRAK；アマシャム社製）に含まれる細胞溶解液を用いて細胞を溶解した。

各条件における細胞のcAMP産生量の測定は、cAMP-EIAシステムを用い、その添付プロトコールに従って実施した。3 μ mol/Lフォルスコリン単独刺激でのcAMP産生量を100%とし、2MeSADP又はADP共存下でのcAMP量の濃度依存曲線を作製した。濃度依存曲線から、HORK3タンパク質に対する2MeSADP及びADPの応答性は、それぞれ $EC_{50}=0.07$ nmol/L及び $EC_{50}=35$ nmol/Lであった。

一方、空ベクター導入CHO細胞では、2MeSADP又はADPを添加しても、フォルスコリン刺激によるcAMP産生量に変化は見られなかった。

実施例5：HORK3タンパク質を発現するC6-15細胞における2MeSADP又はADPによるcAMP産生阻害の確認および阻害剤の影響

ADPや2MeSADPによってフォルスコリン刺激によるcAMPの産生量

を下げない細胞として、C6-15細胞も最適であることが判明したので、ADP受容体タンパク質を発現させるための細胞としてC6-15細胞も用いた。

ADP受容体を発現させるための発現ベクターとしてpEF-BOS-dhfr-HORK3を使用した。

10cmシャーレにC6-15細胞を、 1×10^6 細胞となるようにDMEM培地を用いて播種し、1日培養した後、プラスミドpEF-BOS-dhfr-HORK3 ($8 \mu\text{g}$) とpEF-BOS-neo (Nucleic Acid Res., 18, 5322, 1990; $0.8 \mu\text{g}$) をトランスフェクション試薬 (LipofectAMINE 2000; GIBCO BRL社製) を用いて遺伝子導入した。

前記の遺伝子導入操作から24時間経過した後、遺伝子導入した細胞を回収し、 0.6 mg/mL -G418 (GIBCO BRL社製) を含有するDMEM培地に懸濁した後、段階希釈して10cmシャーレに播き直した。2週間後に出現したコロニーを個別に取得し、HORK3タンパク質発現C6-15細胞として、以下の実験に使用した。

HORK3タンパク質発現C6-15細胞を、96ウェルプレートに 1×10^4 細胞で播種した。1日培養した後、 1 mmol/L -3-イソブチル-1-メチルキサンチン (Sigma社製) 及び 0.1% BSA含有DMEM培地で10分間処理した後、 $1 \mu\text{mol/L}$ フォルスコリン (和光純薬社製) と 2 MeSA DP (最終濃度= $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) との組み合わせ、あるいは、 $1 \mu\text{mol/L}$ フォルスコリンとADP (最終濃度= $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) との組み合わせを滴下した。 37°C で30分間インキュベートした後に培養上清を除去し、 0.2% Triton X-100を含有するPBSを用いて細胞を溶解した。

各条件における細胞のcAMP産生量の測定は、cAMP HTRFキット (CIS bio international社製) を用い、添付プロトコールに従って実施した。 $1 \mu\text{mol/L}$ フォルスコリン単独刺激でのcAMP産生量を100%とし、 2 MeSA DP 又はADP共存下でのcAMP量の濃度依存曲線を作製した。濃度依存曲線から、HORK3タンパク質に対する 2 MeSA

DP及びADPの応答性は、それぞれ $EC_{50}=0.08\text{ nmol/L}$ 、 $EC_{50}=42\text{ nmol/L}$ であった。HORK3タンパク質発現C6-15細胞においても実施例4で示したHORK3タンパク質発現CHO細胞とほぼ同様の性質を示した。

次に、HORK3タンパク質発現C6-15細胞におけるフォスコリン刺激によるcAMP産生量の2MeSADPによる抑制に対する、血小板凝集を抑制することが知られる化合物の影響を検討した。血小板凝集を抑制する化合物として、2MeSAMP (2-methylthio-adenosine monophosphate) (Thromb. Haemost., 81, 111-117, 1999) 又はAR-C69931MX (N6-[2-methylthioethyl]-2-[3,3,3-trifluoropropylthio]-5'-adenylic acid, monoanhydride with dichloromethylenebiphosphonic acid) (J. Med. Chem., 42, 213-220, 1999) を用いた。前記測定系において、 1 mmol/L -3-イソブチル-1-メチルキサンチン (Sigma社製) 及び0.1%BSA含有DMEM培地に2MeSAMP ($10^{-7}\sim 10^{-4}\text{ mol/L}$) 又はAR-C69931MX ($10^{-12}\sim 10^{-6}\text{ mol/L}$) を溶解したもので10分間処理した後、 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ フォスコリン (和光純薬社製) と 10 nmol/L -2MeSADPとの組み合わせを滴下した。37℃で30分間インキュベートした後に培養上清を除去し、0.2%TritonX-100を含有するPBSを用いて細胞を溶解した。cAMP産生量の測定はcAMP HTRFキットを用い、添付プロトコールに従って実施した。 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ フォスコリン単独刺激でのcAMP産生量を0%とし、 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ フォスコリンと 10 nmol/L -2MeSADPとの組み合わせで刺激したときのcAMP産生量を100%として、阻害剤の濃度依存曲線を作製した。濃度依存曲線から、フォスコリン刺激によるcAMP産生量の2MeSADPによる抑制に対する2MeSAMP及びAR-C69931MXの阻害効果は、それぞれ $IC_{50}=5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $IC_{50}=2.4\text{ nmol/L}$ であった。

実施例6：HORK3タンパク質発現C6-15細胞と2MeSADPとの結合実験

実施例5で作製したHORK3タンパク質発現C6-15細胞を回収及び洗浄した後、5mmol/L-EDTAとプロテアーゼインヒビターカクテルセット Complete™（ペーリンガー・マンハイム社製）とを含有する20mmol/L-Tris-HCl（pH7.4）に懸濁して、ポリトロンにてホモジェナイズした。超遠心を行った後、沈殿を1mmol/L-EDTA、100mmol/L-NaCl、0.1%BSA、及びComplete™を含有する50mmol/L-Tris-HCl（pH7.4）に懸濁し、これを膜画分とした。

膜画分20μgに [³H]-2MeSADP（Moravek Biochemical社製）を最終濃度0.25~50nmol/Lになるように加え、1mmol/L-EDTA、100mmol/L-NaCl、0.1%BSA、及びComplete™を含有する50mmol/L-Tris-HCl（pH7.4）250μL中で室温で1時間インキュベーションした後、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。グラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで膜画分への総結合量を測定した。さらに、前述の試験に最終濃度50μmol/L-2MeSADPを加えることで、膜画分への非特異的結合量を測定した。その結果、 [³H]-2MeSADPはHORK3タンパク質発現C6-15細胞の膜画分に特異的に結合することが分かった。この結合のScatchard分析の結果、HORK3タンパク質発現C6-15細胞の膜画分に対する [³H]-2MeSADPの結合の解離定数は $K_d = 0.27 \text{ nmol/L}$ で、最大結合は $B_{\text{max}} = 3.7 \text{ pmol/mg}$ であった。一方、HORK3タンパク質を発現していないホストのC6-15細胞の膜画分では特異的結合は観察されなかった。

次に、2MeSAMP又はAR-C69931MXの影響を、実施例6で作製したHORK3タンパク質発現C6-15細胞の膜画分を用いて、 [³H]-2MeSADPの結合を阻害する活性を指標にして検討した。実際には、HORK3タンパク質発現C6-15細胞膜画分20μgに、2MeSAMP ($10^{-7} \sim 10^{-4} \text{ mol/L}$) 又はAR-C69931MX ($10^{-12} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$)

L) と 1 nmol/L $[^3\text{H}] - 2\text{MeSADP}$ とを添加し、室温で2時間インキュベーションした後、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。グラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。また、同時に、前述の試験において化合物を添加しないもの、及び最終濃度 $10 \mu\text{mol/L}$ 2MeSADP を加えたものを、それぞれ、総結合量、及び非特異的結合量として、放射活性を測定した。それぞれの化合物の濃度依存曲線から、HORK3タンパク質と 2MeSADP との結合に対する 2MeSAMP 及び AR-C69931MX の阻害効果は、それぞれ $\text{IC}_{50} = 4.9 \mu\text{mol/L}$ 、 $\text{IC}_{50} = 9.8 \text{ nmol/L}$ であった。

前記実施例3の結果に併せて、更に、実施例4及び5において、HORK3タンパク質を発現するCHO細胞及びC6-15細胞におけるフォルスコリン刺激によるcAMP産生量が 2MeSADP 又は ADP によって抑制されたことから、本ADP受容体が Gi に共役していることが更に明確になった。また、実施例4及び5の結果から、スクリーニングツール用ポリペプチドの1つであるHORK3タンパク質を発現するCHO細胞又はC6-15細胞の細胞内cAMP濃度の変化を測定することで、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニングが可能となった。また、実施例6に記載の方法で、HORK3タンパク質を発現するC6-15細胞の膜画分への 2MeSADP の結合阻害を測定することで、リガンドのスクリーニングも可能である。

以上、実施例2～6の結果より、HORK3タンパク質は、血小板に発現している Gi 共役型のADP受容体であることから、これまで存在が示唆されていた血小板のADP受容体 P2T_{Ac} の実体であると考えられる。

実施例7：ヒト血小板凝集阻害活性の確認

健常人（成人、男子）より1/10容クエン酸ナトリウムにて採血を行ない、De Marcoらの方法（J. Clin. Invest., 77, 1272-1277, 1986）に従い、多血小板血漿（PRP）を調製した。PRPは、自動血球計数器（MEK6258；日本光電）を用いて、 $3 \times 10^8 / \text{mL}$ に調製して使用した。凝集惹起剤であるADPは、MCメディカル社の製品を使用した。実施例5でHORK3タンパク質アンタゴニスト活性を示すことを確認した

2MeSAMP又はAR-C69931MXを使用し、前記化合物を溶解する溶媒としては、生理食塩水を用いた。

血小板凝集は、血小板凝集計（MCMヘマトレーサー212；MCメディカル）を用いて測定した。すなわち、PRP（80 μ L）とサンプル（2MeSAMP又はAR-C69931MX）又は溶媒（10 μ L）とを、37℃で1分間インキュベートした後、ADP（20～200 μ mol/L）10 μ Lを添加し、透過光の変化を10分間記録し、その最大凝集率から凝集阻害（%）を算出した。

図1に、2MeSAMPを用いた場合の結果を示し、図2に、AR-C69931MXを用いた場合の結果を示す。2MeSAMPのデータ（図1）は、ボランティア2名を用いた実験結果の「平均値」で表し、AR-C69931MXのデータ（図2）は、ボランティア3名を用いた実験結果の「平均値＋標準誤差」で表した。両薬剤ともに、ADP惹起血小板凝集を濃度依存的に阻害し、その阻害強度は、惹起剤であるADPの濃度に依存していた。

本実施例より、HORK3タンパク質アンタゴニストが抗血小板作用を示すことが明確である。

産業上の利用可能性

血小板ADP受容体P2T_{AC}活性を阻害する物質は、抗血小板作用を示し、血栓性弊害の治療を可能とする。

従って、本発明の抗血小板剤スクリーニングツールによれば、抗血小板剤として有用な血小板ADP受容体P2T_{AC}アンタゴニストをスクリーニング及び評価することができる。

本発明のアンタゴニスト若しくはアゴニスト検出方法を用い、又は本発明のリガンド検出方法とアンタゴニスト若しくはアゴニスト検出方法とを組み合わせる用いることにより、血小板ADP受容体P2T_{AC}アンタゴニストを選択し、抗血小板剤として有用な物質をスクリーニングすることができる。

次いで、前記スクリーニング方法で選択された物質を有効成分とし、担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて製剤化することにより、抗血小板用医薬組成物を製造することができる。

また、本発明のリガンド、アンタゴニスト、又はアゴニスト検出方法は、抗血小板剤として有用な物質をスクリーニングする為のみでなく、抗血小板用医薬組成物の品質規格の確認試験において、用いることも可能である。

本発明のリガンド、アンタゴニスト又はアゴニスト検出方法を用いて、試験化合物が血小板ADP受容体P2T_A。リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出し、次いで、前記アンタゴニスト又はリガンドを製剤化することにより、抗血小板用医薬組成物を製造することができる。

配列表フリーテキスト

配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号3又は配列番号4の配列で表される塩基配列からなる各オリゴヌクレオチドは、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、又は
(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、ADPと結合し、Giに共役することにより、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を有するポリペプチドである、抗血小板剤スクリーニングツール。
2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項1に記載の抗血小板剤スクリーニングツール。
3. 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、ADPと結合し、Giに共役することにより、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を有するポリペプチドである、抗血小板剤スクリーニングツール。
4. 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項3に記載の抗血小板剤スクリーニングツール。
5. 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である、抗血小板剤スクリーニングツール。
6. 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である、請求項5に記載の抗血小板剤スクリーニングツール。
7. 請求項3に記載のポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である、抗血小板剤スクリーニングツール。
8. 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である、請求項7に記載の抗血小板剤スクリーニングツール。
9. 請求項1若しくは3に記載のポリペプチド、前記ポリペプチドを含む細胞膜

画分、又は請求項5若しくは7に記載の形質転換細胞と、試験化合物とを、ADP受容体P2T_{AC}標識リガンド存在下で、接触させる工程、及び前記ポリペプチド、細胞膜画分、又は形質転換細胞への標識リガンドの結合量の変化を分析する工程を含む、試験化合物がADP受容体P2T_{AC}リガンドであるか否かを検出する方法。

10. C末端のアミノ酸配列が、配列番号11で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性Gタンパク質のホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドとGiの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるGタンパク質キメラを共発現している請求項5又は7に記載の形質転換細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び前記形質転換細胞内におけるCa²⁺濃度の変化を分析する工程を含む、試験化合物がADP受容体P2T_{AC}アンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する方法。

11. 請求項5又は7に記載の形質転換細胞と試験化合物とを、血小板ADP受容体P2T_{AC}のアゴニストの共存下において、接触させる工程、及び前記形質転換細胞内におけるcAMP濃度の変化を分析する工程を含む、試験化合物がADP受容体P2T_{AC}アンタゴニスト又はアゴニストであるか否かを検出する方法。

12. 請求項9～11のいずれか一項に記載の方法、あるいは、これらを組み合わせることによる、ADP受容体P2T_{AC}リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出する工程、及びADP受容体P2T_{AC}アンタゴニストを選択する工程を含む、抗血小板剤をスクリーニングする方法。

13. 請求項9～11のいずれか一項に記載の方法、あるいは、これらを組み合わせることによる、ADP受容体P2T_{AC}リガンド、アンタゴニスト、又はアゴニストであるか否かを検出する工程、及び製剤化工程を含む、抗血小板用医薬組成物の製造方法。

1 / 1

FIG. 1

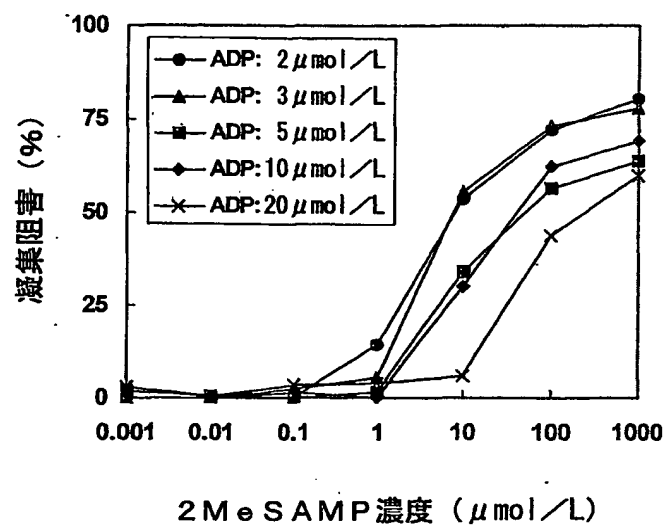
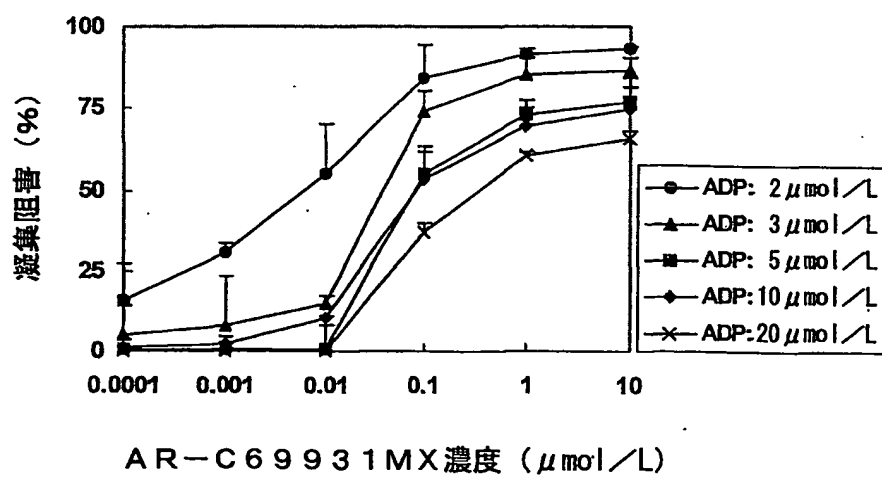


FIG. 2



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Method for screening antiplatelet agents

<130> Y0122PCT-656

<150> JP 2000-334721

<151> 2000-11-01

<150> JP 2001-3577

<151> 2001-01-11

<160> 12

<210> 1

<211> 1029

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1029)

<400> 1

atg	caa	gcc	gtc	gac	aac	ctc	acc	tct	gcg	cct	ggg	aac	acc	agt	ctg	48
Met	Gln	Ala	Val	Asp	Asn	Leu	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	Asn	Thr	Ser	Leu	
1				5					10					15		

tgc	acc	aga	gac	tac	aaa	atc	acc	cag	gtc	ctc	ttc	cca	ctg	ctc	tac	96
Cys	Thr	Arg	Asp	Tyr	Lys	Ile	Thr	Gln	Val	Leu	Phe	Pro	Leu	Leu	Tyr	
		20						25				30				

act	gtc	ctg	ttt	ttt	gtt	gga	ctt	atc	aca	aat	ggc	ctg	gcg	atg	agg	144
Thr	Val	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Leu	Ile	Thr	Asn	Gly	Leu	Ala	Met	Arg	
		35					40					45				

att	ttc	ttt	caa	atc	cgg	agt	aaa	tca	aac	ttt	att	att	ttt	ctt	aag	192
Ile	Phe	Phe	Gln	Ile	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Phe	Ile	Ile	Phe	Leu	Lys	
		50					55				60					

aac	aca	gtc	att	tct	gat	ctt	ctc	atg	att	ctg	act	ttt	cca	ttc	aaa	240
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Asn	Thr	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Ile	Leu	Thr	Phe	Pro	Phe	Lys	
65					70					75					80	
att	ctt	agt	gat	gcc	aaa	ctg	gga	aca	gga	cca	ctg	aga	act	ttt	gtg	288
Ile	Leu	Ser	Asp	Ala	Lys	Leu	Gly	Thr	Gly	Pro	Leu	Arg	Thr	Phe	Val	
				85					90					95		
tgt	caa	gtt	acc	tcc	gtc	ata	ttt	tat	ttc	aca	atg	tat	atc	agt	att	336
Cys	Gln	Val	Thr	Ser	Val	Ile	Phe	Tyr	Phe	Thr	Met	Tyr	Ile	Ser	Ile	
			100					105					110			
tca	ttc	ctg	gga	ctg	ata	act	atc	gat	cgc	tac	cag	aag	acc	acc	agg	384
Ser	Phe	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr	Ile	Asp	Arg	Tyr	Gln	Lys	Thr	Thr	Arg	
			115				120					125				
cca	ttt	aaa	aca	tcc	aac	ccc	aaa	aat	ctc	ttg	ggg	gct	aag	att	ctc	432
Pro	Phe	Lys	Thr	Ser	Asn	Pro	Lys	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Lys	Ile	Leu	
			130			135					140					
tct	gtt	gtc	atc	tgg	gca	ttc	atg	ttc	tta	ctc	tct	ttg	cct	aac	atg	480
Ser	Val	Val	Ile	Trp	Ala	Phe	Met	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Pro	Asn	Met	
145					150					155					160	
att	ctg	acc	aac	agg	cag	ccg	aga	gac	aag	aat	gtg	aag	aaa	tgc	tot	528
Ile	Leu	Thr	Asn	Arg	Gln	Pro	Arg	Asp	Lys	Asn	Val	Lys	Lys	Cys	Ser	
				165					170					175		
ttc	ctt	aaa	tca	gag	ttc	ggt	cta	gtc	tgg	cat	gaa	ata	gta	aat	tac	576
Phe	Leu	Lys	Ser	Glu	Phe	Gly	Leu	Val	Trp	His	Glu	Ile	Val	Asn	Tyr	
			180					185					190			
atc	tgt	caa	gtc	att	ttc	tgg	att	aat	ttc	tta	att	gtt	att	gta	tgt	624
Ile	Cys	Gln	Val	Ile	Phe	Trp	Ile	Asn	Phe	Leu	Ile	Val	Ile	Val	Cys	
			195				200					205				
tat	aca	ctc	att	aca	aaa	gaa	ctg	tac	cgg	tca	tac	gta	aga	acg	agg	672
Tyr	Thr	Leu	Ile	Thr	Lys	Glu	Leu	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Val	Arg	Thr	Arg	
			210				215					220				
ggt	gta	ggt	aaa	gtc	ccc	agg	aaa	aag	gtg	aac	gtc	aaa	gtt	ttc	att	720
Gly	Val	Gly	Lys	Val	Pro	Arg	Lys	Lys	Val	Asn	Val	Lys	Val	Phe	Ile	
225					230					235					240	

3/7

atc att gct gta ttc ttt att tgt ttt gtt cct ttc cat ttt gcc cga 768
 Ile Ile Ala Val Phe Phe Ile Cys Phe Val Pro Phe His Phe Ala Arg
 245 250 255

att cct tac acc ctg agc caa acc cgg gat gtc ttt gac tgc act gct 816
 Ile Pro Tyr Thr Leu Ser Gln Thr Arg Asp Val Phe Asp Cys Thr Ala
 260 265 270

gaa aat act ctg ttc tat gtg aaa gag agc act ctg tgg tta act tcc 864
 Glu Asn Thr Leu Phe Tyr Val Lys Glu Ser Thr Leu Trp Leu Thr Ser
 275 280 285

tta aat gca tgc ctg gat ccg ttc atc tat ttt ttc ctt tgc aag tcc 912
 Leu Asn Ala Cys Leu Asp Pro Phe Ile Tyr Phe Phe Leu Cys Lys Ser
 290 295 300

ttc aga aat tcc ttg ata agt atg ctg aag tgc ccc aat tct gca aca 960
 Phe Arg Asn Ser Leu Ile Ser Met Leu Lys Cys Pro Asn Ser Ala Thr
 305 310 315 320

tct ctg tcc cag gac aat agg aaa aaa gaa cag gat ggt ggt gac cca 1008
 Ser Leu Ser Gln Asp Asn Arg Lys Lys Glu Gln Asp Gly Gly Asp Pro
 325 330 335

aat gaa gag act cca atg taa 1029
 Asn Glu Glu Thr Pro Met
 340

<210> 2
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Gln Ala Val Asp Asn Leu Thr Ser Ala Pro Gly Asn Thr Ser Leu
 1 5 10 15
 Cys Thr Arg Asp Tyr Lys Ile Thr Gln Val Leu Phe Pro Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Thr Val Leu Phe Phe Val Gly Leu Ile Thr Asn Gly Leu Ala Met Arg
 35 40 45
 Ile Phe Phe Gln Ile Arg Ser Lys Ser Asn Phe Ile Ile Phe Leu Lys
 50 55 60

4/7

Asn Thr Val Ile Ser Asp Leu Leu Met Ile Leu Thr Phe Pro Phe Lys
 65 70 75 80
 Ile Leu Ser Asp Ala Lys Leu Gly Thr Gly Pro Leu Arg Thr Phe Val
 85 90 95
 Cys Gln Val Thr Ser Val Ile Phe Tyr Phe Thr Met Tyr Ile Ser Ile
 100 105 110
 Ser Phe Leu Gly Leu Ile Thr Ile Asp Arg Tyr Gln Lys Thr Thr Arg
 115 120 125
 Pro Phe Lys Thr Ser Asn Pro Lys Asn Leu Leu Gly Ala Lys Ile Leu
 130 135 140
 Ser Val Val Ile Trp Ala Phe Met Phe Leu Leu Ser Leu Pro Asn Met
 145 150 155 160
 Ile Leu Thr Asn Arg Gln Pro Arg Asp Lys Asn Val Lys Lys Cys Ser
 165 170 175
 Phe Leu Lys Ser Glu Phe Gly Leu Val Trp His Glu Ile Val Asn Tyr
 180 185 190
 Ile Cys Gln Val Ile Phe Trp Ile Asn Phe Leu Ile Val Ile Val Cys
 195 200 205
 Tyr Thr Leu Ile Thr Lys Glu Leu Tyr Arg Ser Tyr Val Arg Thr Arg
 210 215 220
 Gly Val Gly Lys Val Pro Arg Lys Lys Val Asn Val Lys Val Phe Ile
 225 230 235 240
 Ile Ile Ala Val Phe Phe Ile Cys Phe Val Pro Phe His Phe Ala Arg
 245 250 255
 Ile Pro Tyr Thr Leu Ser Gln Thr Arg Asp Val Phe Asp Cys Thr Ala
 260 265 270
 Glu Asn Thr Leu Phe Tyr Val Lys Glu Ser Thr Leu Trp Leu Thr Ser
 275 280 285
 Leu Asn Ala Cys Leu Asp Pro Phe Ile Tyr Phe Phe Leu Cys Lys Ser
 290 295 300
 Phe Arg Asn Ser Leu Ile Ser Met Leu Lys Cys Pro Asn Ser Ala Thr
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Gln Asp Asn Arg Lys Lys Glu Gln Asp Gly Gly Asp Pro
 325 330 335
 Asn Glu Glu Thr Pro Met
 340

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 3

cctctagaat gcaagccgtc gacaacctca cctc

34

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 4

cctctagact attacattgg agtctcttca ttg

34

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gcaagccgtc gacaacc

17

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tgattttgta gtctctggtg caca

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cacctctgcg cctggtaaca ccag

24

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

cactgagcgc ggctaca

17

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

cttaatgtca cgcacgattt cc

22

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

cttcaccacc acggccgagc

20

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Cys Gly Leu Phe

1

5

7/7

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Tyr Asn Leu Val

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09534

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15,
A61K45/00, A61P7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15,
A61K45/00, A61P7/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 01/46454 A1 (CORTHERAPEUTICS, INC.), 28 June, 2001 (28.06.2001) & AU 200122886 A	1-13
A	WO 98/50549 A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 12 November, 1998 (12.11.1998) & US 6060272 A & EP 1007670 A	1-13
A	WO 00/31258 A (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.), 02 June, 2000 (02.06.2000) & EP 1133559 A	1-13
A	WO 00/22131 A (BEHAN, Dominic, P.), 20 April, 2000 (20.04.2000) & EP 1137776 A	1-13
A	WO 00/28028 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.), 18 May, 2000 (18.05.2000) & EP 1127126 A	1-13
A	WO 00/53742 A (CURAGEN CORPORATION), 14 September, 2000 (14.09.2000)	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 December, 2001 (21.12.01)

Date of mailing of the international search report
15 January, 2002 (15.01.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09534

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& AU 200037360 A	
A	WO 00/34333 A (ASTRA AKTIEBORAG), 15 June, 2000 (15.06.2000) & EP 1147135 A	1-13
PA	Fang L.ZHANG et al. ADP Is The Cognate Ligand for the Orohang Protein-coupled Receptor SP1999 THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY March 20001, Vol.276, No.11, pp.8608-8615	1-13
PA	BIOSIS NO.:200100322024 & Conley PAMELA et al. Molecular identification of the "platelet" "ADP" "receptor" targeted by antithrombotic drugs. Blood November 2000, Vol.96, No.11, p.222a	1-13
PA	BIOSIS NO.:200100028429 & Von KUEGELGEN et al. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology November 2000, Vol.362, Nos.4-5, pp.310-323	1-13
A	BIOSIS NO.:199900183703 & Kunapuli SATYA P Molecular Physiology of "platelet" "ADP" "receptors". Drug Deveropment Reseach November 1998, Vol.45, Nos.3-4, pp.135-139	1-13
A	BIOSIS NO.:199900164817 & Jantzen Hans-MICHAEL et al. Evidence for two distinct G-protein-coupled "ADP" "receptors" mediating "platelet" activation. Thrombosis and Haemostasis January 1999, Vol.81, No.1, pp.111-117	1-13
A	BIOSIS NO.:199800400876 & Puri RAJINDER N et al. Purinergic receptors in human blood "platelets": Chemical modification and "cloning" investigations. Journal of Protein Chemistry July 1998, Vol.17, No.5, pp.429-451	1-13

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/09534

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P7/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P7/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO 01/46454 A1 (CORTHERAPEUTICS, INC.) 28.06月.2001 (28.06.01) & AU 200122886 A	1-13
A	WO 98/50549 A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 12.11月.1998 (12.11.98) & US 6060272 A & EP 1007670 A	1-13
A	WO 00/31258 A (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.) 02.06月.2000 (02.06.00) & EP 1133559 A	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 21.12.01	国際調査報告の発送日 15.01.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/22131 A (BEHAN, Dominic, P.) 20. 04月. 2000 (20. 04. 00) & EP 1137776 A	1-13
A	WO 00/28028 A (MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 18. 05月. 2000 (18. 05. 00) & EP 1127126 A	1-13
A	WO 00/53742 A (CURAGEN CORPORATION) 14. 09月. 2000 (14. 09. 00) & AU 200037360 A	1-13
A	WO 00/34333 A (ASTRA AKTIEBORAG) 15. 06月. 2000 (15. 06. 00) & EP 1147135 A	1-13
PA	Fang L. ZHANG et al. ADP Is The Cognate Ligand for the Orohan G Protein-coupled Receptor SP1999 THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY March 20001, Vol. 276, No. 11, p. 8608-8615	1-13
PA	BIOSIS NO.: 200100322024 & Conley PAMELA et al. Molecular identification of the "platelet" "ADP" "receptor" targeted by antithrombotic drugs. Blood November 2000, Vol. 96, No. 11, p. 222a	1-13
PA	BIOSIS NO.: 200100028429 & Von KUEGELGEN et al. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology November 2000, Vol. 362, No. 4-5, p. 310-323	1-13
A	BIOSIS NO.: 199900183703 & Kunapuli SATYA P Molecular Physiology of "platelet" "ADP" "receptors". Drug Deveropment Reseach November 1998, Vol. 45, No. 3-4, p. 135-139	1-13
A	BIOSIS NO.: 199900164817 & Jantzen Hans-MICHAEL et al. Evidence for two distinct G-protein-coupled "ADP" "receptors" mediating "platelet" activation. Thrombosis and Haemostasis January 1999, Vol. 81, No. 1, p. 111-117	1-13
A	BIOSIS NO.: 199800400876 & Puri RAJINDER N et al. Purinergic receptors in human blood "platelets": Chemical modification and "cloning" investigations. Journal of Protein Chemistry July 1998, Vol. 17, No. 5, p. 429-451	1-13